

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有權機關
國際事務局



(43) 国際公開日
2003年2月13日(13.02.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/011343 A1

(51) 國際特許分類7: A61K 48/00, 38/18, 45/00,
35/12, 35/32, A61L 27/00, A61P 19/00

(72) 発明者; および

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/06727

(22) 國際出願日: 2002年7月3日 (03.07.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権デ一タ：
特願2001-227979 2001年7月27日(27.07.2001) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY)[JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP). 科学技術振興事業団(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 植村 壽公 (UEMURA,Toshimasa) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県つくば市並木 3-674-101 Ibaraki (JP). 立石 哲也 (TATEISHI,Tetsuya) [JP/JP]; 〒305-0042 茨城県つくば市下広岡 670-3 Ibaraki (JP). 小島 弘子 (KOJIMA,Hiroko) [JP/JP]; 〒305-0031 茨城県つくば市吾妻 3-18-1-101 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI,Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): JP, US.

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

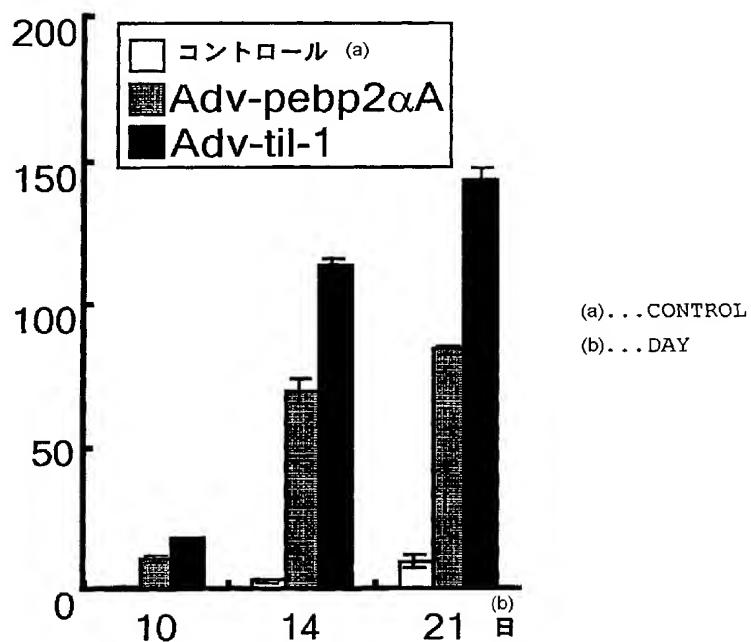
添付公開書類:
— 國際調查報告書

〔有葉綱〕

(54) Title: METHOD OF REGENERATING BONE/CHONDRAL TISSUES BY TRANSFERRING TRANSCRIPTIONAL FACTOR GENE

(54) 発明の名称: 転写因子の遺伝子導入による骨・軟骨組織再生方法

(m g / ϕ 3.5cm dish)



(57) Abstract: A method of efficiently constructing a bone/chondral tissue by isolating cells from a living body and quickly and appropriately culturing the same; and implants containing bone/chondral tissues obtained by this method. Namely, bone marrow-origin cells isolated from a living body are transfected with a gene of a bone/cartilage-inducing transcriptional factor by using an adenovirus or retrovirus vector and proliferated on an appropriate scaffold. The bone/chondral tissue thus constructed can be used as an implant substituting for a bone or cartilage by embedding together with the scaffold material into a living body.

[続葉有]

WO 03/011343 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明は、生体から単離した細胞を迅速かつ的確に培養し、効率良く骨・軟骨組織を構築する方法、及び該方法によって、作製された骨・軟骨組織を含むインプラントを提供する。すなわち、生体から単離した骨髓由来細胞に骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子をアデノウィルス又はレトロウィルスベクターを用いてトランスフェクトし、適当な足場上で増殖させる。構築された骨・軟骨組織は足場材料とともに生体内に埋入することで、骨・軟骨代替用インプラントとして利用できる。

明細書

転写因子の遺伝子導入による骨・軟骨組織再生方法

5 技術分野

本発明は、骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子導入による骨・軟骨組織の再生方法に関する。さらに詳しくは、骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を導入することによって、目的とする組織への細胞の分化誘導を促し、効率的な骨・軟骨組織の構築を可能にする方法、及び該方法によって作製される骨・軟骨代替用インプラントに関する。

背景技術

近年、再生医療の現場では生体から取り出した自己の細胞を *in vitro* で培養・組織化して限りなく生体に近い組織を再構築し、これを再び生体内に戻すという研究が進められている。こうした組織再生においては、細胞の確保はもちろんのこと、細胞増殖のための足場の提供、分化誘導の促進が不可欠となる。

通常生体内では、細胞は細胞外マトリックスに接着して存在し、これを足場として分化・増殖する。したがって、生体外における培養、完全な三次元組織化のためには、細胞に加えて、細胞の増殖・分化のための適切な足場が必要である。従来、骨・軟骨等の硬組織の再生においては、多孔性セラミックス等の多孔質生体吸収性素材を足場として用いることで良好な結果が得られている。

一方、組織再生のための組織工学的アプローチにおいては、生体外での細胞培養時にいかに早く目的の組織に分化させるかということが重要な問

題となる。これに対し、従来の多くの試みでは細胞の分化誘導をつかさどるサイトカイン(液性因子)を直接細胞に導入するか、又は目的のサイトカインのcDNAを組み込んだ発現ベクターをリポフェクション法等によって細胞内に導入し、発現させることによりある程度の成功を収めてきた。

5 しかし、細胞増殖因子の導入は、目的のサイトカインが100%その組織に特異的に効果を及ぼすとは限らないことや、リポフェクション法による遺伝子導入は樹立細胞株ではある程度の成功をおさめても、初代培養細胞に対しては、殆ど0に近い導入効率しか得られないと、などの問題があり、十分満足のいく結果が得られていなかった。

10 最近、骨芽細胞の分化には転写因子、特にrunt型及びHelix-Loop-Helix (HLH)型の転写因子が重要な意味を持つことが、多くの研究者により明らかにされてきた。例えば runt型転写因子としては、Pebp2alphaA (Pebp2 α A) /Cbfal、HLH型転写因子としては、Scleraxis、Id-1、I-mfa等が骨芽細胞分化に重要な意味を持つことが報告されている（辻 邦和 他：「骨芽細胞の
15 分化に関するRunt型転写因子 Cbfal/Pebp2 α Aならびに骨・軟骨形成におけるSox9の機能と骨形成異常」実験医学、16(11), 25-32, 1998など）。しかしながら、これらの転写因子の機能を生かした組織再生の具体的な試みは未だ報告されていない。

そこで、本発明者らは銳意検討した結果、骨・軟骨誘導性転写因子を骨
20 髓由来細胞に導入し、発現させることにより、該細胞を効率よく骨・軟骨組織に分化誘導しうることを見出した。さらに、転写因子の導入にアデノウイルス又はレトロウイルスベクターを用いれば、骨・軟骨細胞等の接着細胞の初代培養系細胞に効率よく感染し、99%程度の極めて効率のよい分化誘導が期待できることを見出し、本発明を完成させた。

25 すなわち、本発明は以下の(1)～(13)を提供するものである。

- (1) 骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を単離された細胞に導入し、該細胞を分化増殖させる工程を含む、骨・軟骨組織の作製方法。
- (2) 前記細胞が骨髓由来細胞である、上記（1）の方法。
- (3) 前記骨髓由来細胞が間葉系幹細胞である、上記（2）記載の方法。
- 5 (4) 前記骨髓由来細胞が骨芽細胞である、上記（2）記載の方法。
- (5) 前記細胞が初代培養細胞である、上記（1）～（4）のいずれか1項に記載の方法。
- (6) 前記細胞が患者から単離された細胞である、上記（5）記載の方法。
- (7) 前記骨・軟骨誘導性転写因子が、Cbfa1、Dlx-5、Bapx1、Msx2、Scleraxis 及びSox-9 からなる群より選ばれる1種又は2種以上である、上記
10 (1)～(6) のいずれか1項に記載の方法。
- (8) 骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子の細胞への導入がアデノウィルスベクター又はレトロウィルスベクターを用いて行われる、上記（1）～（7）のいずれか1項に記載の方法。
- 15 (9) 骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を導入した細胞の増殖が、多孔性セラミックス、コラーゲン、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、ならびにこれらの複合体からなる群より選ばれる1種又は2種以上を足場として行われる、上記（1）～（8）のいずれか1項に記載の方法。
- 20 (10) 以下の工程を含む、骨・軟骨組織の作製方法。
- 1) 生体から単離した骨髓由来細胞をデキサメタゾン、免疫抑制剤、骨形成タンパク質及び骨形成液性因子からなる群より選ばれる1種又は2種以上によって分化誘導する工程。
- 2) 上記細胞に骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子をアデノウィルスベ
25 クター又はレトロウィルスベクターを用いてトランスフェクトす

る工程。

- 3) 上記細胞を多孔性セラミックス、コラーゲン、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、ならびにこれらの複合体からなる群より選ばれる1種又は2種以上を足場として増殖させる工程。
- 5 (11) 上記(1)～(10)のいずれか1項に記載の方法によって作製された骨・軟骨組織を含む、インプラント。
- (12) さらに、多孔性セラミックス、コラーゲン、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、ならびにこれらの複合体からなる群より選ばれる1種又は2種以上からなる足場材料を含む、上記(11)記載のインプラント。
- 10 (13) 骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を導入した細胞を含む、多孔性セラミックス、コラーゲン、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、ならびにこれらの複合体からなる群より選ばれる1種又は2種以上を含む、インプラント。

15 発明の開示

以下、本発明について詳細に説明する。

1. 骨・軟骨組織の作製

本発明は、骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を単離された細胞に導入し、該細胞を分化増殖させることにより、骨・軟骨組織を生体外で作製する方法に関する。

1. 1 転写因子

本発明に用いられる転写因子は、未分化の細胞を骨及び／又は軟骨に分化誘導する、骨・軟骨誘導性の転写因子であり、例えばCbfa1、Dlx-5、Bapx1、Msx2、Scleraxis、Sox-9 が挙げられる。Cbfa1は1993年京都大学の小川らによってクローニングされ、大阪大学の小守らにより間葉系幹細胞から骨

芽細胞に分化誘導するのに必要不可欠であることが確認された転写因子である (Komori, T. et al., (1997) *Cell* 89, 755-764)。このCbfa1には2つのアイソフォーム、til-1とpepb2 α Aが存在する。Dlx-5は、*Drosophila distalless* (D11) 遺伝子の相同遺伝子で、軟骨骨膜や内膜の骨化に関わる転写因子である(Acampora, D. et al., (1999) *Development* 126, 3795-3809)。Bapx1は、*Drosophila bagpipe homeobox*遺伝子の相同遺伝子で、特に脊髄での間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化に関わっており、Cbfa1遺伝子の調節遺伝子の1つと考えられている (Triebioli, C. et al., (1999) *Development* 126, 5699-5711)。Msx2は、*Drosophila muscle segment homeobox* (Msh) 遺伝子の相同遺伝子で頭蓋骨の骨化に関わっており、Cbfa1遺伝子の調節遺伝子の1つと考えられている (Satokata, I. et al., (2000) *Nature Genet.* 24, 391-395)。Scleraxisは、間葉系幹細胞から軟骨細胞や結合組織への分化誘導に関わる転写因子である (Cserjesi, P. et al., (1995) *Development* 121, 1099-1110)。Sox-9は、軟骨で発現しており、type II Collagen等の軟骨分化に関わる遺伝子の発現調節をしている (Ng, L. J. et al., (1997) *Dev. Biol.* 183, 108-121)。

本発明において、前記骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子は、常法に従い公知の配列を基に調整することができる。例えば、骨芽細胞からRNAを抽出し、公知の配列を元にプライマーを作製し、PCR法でクローニングすることにより目的とする転写因子のcDNAを調整することができる。

1. 2 細胞の分化誘導

本発明に用いられる細胞は、生体から単離された分化・増殖能力を有する未分化の細胞であり、例えば、ES細胞、間葉系幹細胞、又は間葉系細胞から分化した骨芽細胞等が挙げられる。なかでも骨髄由来の間葉系幹細胞が好ましく、骨芽細胞がより好ましい。特に、本発明を再生医療の現場

で利用する場合には、前記細胞は患者の体内から単離された細胞である。

該細胞は、常法に従い結合組織などを除去して調製することが望ましい。

また、細胞は一次培養を行い、予め増殖させてから用いてもよい。

前記細胞は適当な薬剤を用いて処理することにより、目的とする組織を構築する細胞に分化誘導をしておくことが必要である。例えば、骨組織再生の場合には、デキサメタゾン、FK-506やシクロスボリン等の免疫抑制剤、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7及びBMP-9等の骨形成タンパク質 (BMP: Bone Morphogenetic Proteins) 、TGF β 等の骨形成液性因子から選ばれる 1種又は2種以上を添加して細胞を骨系細胞に分化誘導することが好まし
い。

1. 3 転写因子遺伝子の導入

本発明において、骨・軟骨誘導性転写因子遺伝子の標的細胞への導入は、動物細胞のトランスフェクションに通常用いられる方法、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、アデノウィルスやレトロウィルス、バキュロウィルス等をベクターとして用いる方法等を用いることができるが、アデノウィルス又はレトロウィルスをベクターとして用いる方法が安全性、導入効率の点から好ましく、特にアデノウィルスを用いた方法が最も好ましい。

前記アデノウィルス又はレトロウィルスベクターは、周知の方法に基づいて調製することができる。例えばアデノウィルスベクターの調整は、Miyake らの方法 (Miyake, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:1320-1324, (1993)) に基づいて行えばよいが、市販のキット、例えば Adenovirus Cre/loxP Kit (宝酒造社製) 等を用いることもできる。このキットはP1ファージのCreリコンビナーゼとその認識配列であるloxPを用いた新たな発現制御系 (Kanegae Y. et al., 1995 Nucl. Acids Res. 23, 3816)

による組換えアデノウィルスベクター作製キットで、転写因子遺伝子を組み込んだ組換えアデノウィルスベクターを簡便に作製することができる。なお、アデノウィルス感染の moi (multiplicity of infection) は、10 以上、好ましくは50～200、より好ましくは100前後(80～120程度)がよい。

5 1. 4 細胞の増殖

トランスフェクトした細胞は完全な三次元構造を構築するために、適当な足場を用いて増殖させることが必要である。足場材料としては、例えばハイドロキシアパタイトや β -TCP (リン酸三カルシウム)、 α -TCP 等の多孔性セラミックス、コラーゲン、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、ならびにこれらの複合体 (例えば、ポリ乳酸/ポリグリコール酸樹脂/コラーゲン複合体等) 等が挙げられる。これらの足場材料は 1 種類であってもよいし、あるいは 2 種以上を組み合わせて用いてもよい。特に、多孔性のセラミックスは力学的強度が高いという点で、組織再生の足場として好ましい。

前記足場材料は、細胞の均一な播種が可能となるよう、多孔性であることが好ましい。なお、本明細書中において「多孔(性)」とは、気孔率が 40 % 以上を意味するものとする。また、孔の大きさは特に限定されないが、骨再生がおきやすいという点では直径 200 μm ～500 μm が好ましい。

細胞の増殖は、前記足場材料に、該細胞を播種して、通常の方法により培養すればよい。細胞の播種は、足場材料に単に播種するだけでもよく、あるいは、緩衝液、生理食塩水、注射用溶媒、あるいはコラーゲン溶液等の液体とともに混合して播種してもよい。また、材料によって、細胞が孔の中にスムーズに入らない場合は、引圧条件下で播種してもよい。

播種する細胞の数 (播種密度) は細胞の形態を維持して組織再生をより効率よく行わせるため、用いる細胞や足場材料に応じて適宜調整することが望ましい。たとえば、骨芽細胞であれば、播種密度は100万個／ml以上で

あることが望ましい。

細胞培養に用いられる培地としては、MEM培地、 α -MEM培地、DMEM培地等、公知の培地を培養する細胞に合わせて適宜選んで用いることができる。また、該培地には、FBS (Sigma社製)、Antibiotic-Antimycotic (GIBCO BRL 社製) 等の抗生物質等を添加しても良い。培養は、3~10% CO₂、30~40℃、特に5% CO₂、37℃の条件下で行うことが望ましい。培養期間は、特に限定されないが、少なくとも4日、好ましくは7日、より好ましくは2週間以上であるとよい。

2. 骨・軟骨組織を含むインプラント

前記方法によって作製された骨・軟骨組織は、足場材料とともに、あるいは足場材料とは別個に、生体内に埋入あるいは注入することで、骨・軟骨代替用インプラントとして利用できる。すなわち、本発明は生体外で構築された骨・軟骨組織を含むインプラントを提供する。

本発明のインプラントにおいて、骨・軟骨組織は足場材料と別個に移植してもよいが、足場材料とともに移植されることが好ましい。該足場材料は、インプラントの目的や適用部位により、前記した足場材料の中から適宜最適なものを選べばよい。たとえば、強度を必要とする移植箇所（あるいは手術法）については、ハイドロキシアパタイトが好ましく、強度を必要としない移植箇所（あるいは手術法）については、生体吸収性の β -TCP 等が好ましい。

本発明のインプラントの形態及び形状は、特に限定されず、スponジ、メッシュ、不織布状成形物、ディスク状、フィルム状、棒状、粒子状、及びペースト状等、任意の形態及び形状を用いることができる。こうした形態や形状は、インプラントの目的に応じて適宜選択すればよい。

本発明のインプラントは、その目的と効果を損なわない範囲において、

骨・軟骨組織及び足場材料のほか、適宜他の成分を含んでいてもよい。そのような成分としては、例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、血小板分化増殖因子（PDGF）、インスリン、インスリン様増殖因子（IGF）、肝細胞増殖因子（HGF）、グリア誘導神経栄養因子（GDNF）、神経栄養因子（NF）、
5 ホルモン、サイトカイン、骨形成因子（BMP）、トランスフォーミング増殖因子（TGF）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）等の増殖因子、骨形成タンパク質、St、Mg、Ca及びCO₃等の無機塩、クエン酸及びリン脂質等の有機物、薬剤等を挙げることができる。

本発明のインプラントにおいて、骨・軟骨組織は転写因子の遺伝子を導入した細胞から構築される。骨・軟骨組織の構築は移植前（in vitro）のみならず、移植後の骨欠損部（in vivo）においても引き続き行われてよい。本発明のインプラントは、骨親和性及び骨形成能が高く、生体適用後すみやかに生体骨と一体化し、骨欠損部の再生を可能にする。

15 図面の簡単な説明

図1は、TypeI Cbfal (pepb2αA) 及び TypeII/III Cbfal (til-1) の構造を示す図である。

図2は、Cbfal 遺伝子導入のための pAxCALNLw コスミドの構造を示す図である。

20 図3は、ラット骨芽細胞における LacZ の発現量を Xgal 染色した結果を示す写真である。

図4は、ラット骨芽細胞における LacZ の発現量を定量化した結果を示すグラフある。

25 図5は、組換えアデノウィルス感染後のラット骨芽細胞におけるアルカリ フオスファターゼ活性の変化を示すグラフである。

図 6 は、組換えアデノウィルス感染後のラット骨芽細胞におけるカルシウム量の変化を示すグラフである。

図 7 は、*Cbfal* 遺伝子発現量をノーザンハイブリダイゼーションにより検出した結果を示す画像である。

5 図 8 は、組換えアデノウィルス感染後のラット骨芽細胞の増殖を示すグラフである。

図 9 は、組換えアデノウィルス感染後のラット骨芽細胞における石灰化の様子を von kossa 染色で観察した結果を示す写真である。

10 図 10 は、組換えアデノウィルス感染後のラット骨芽細胞における石灰化の様子をアリザリンレッド染色で観察した結果を示す写真である。

図 11 は、ラット背上皮内移植後 4 週間目のブロックから得た組織片をヘマトキシリン/エオジン染色した結果を示す写真である。

図 12 は、ラット背上皮内移植後 8 週間目のブロックから得た組織片をヘマトキシリン/エオジン染色した結果を示す写真である。

15 図 13 は、ラット背上皮内移植後のブロックにおけるアルカリフォスファターゼ活性の変化を示すグラフである。

図 14 は、ラット背上皮内移植後のブロックにおけるオステオカルシン量の変化を示すグラフである。

20 図 15 は、ラット背上皮及び大腿骨内移植後のブロックから得た組織片をヘマトキシリン/エオジン染色した結果を示す写真である。

A-a : コントロール背上皮内移植 3 週間後

A-b : コントロール背上皮内移植 5 週間後

A-c : *Cbfal*(til-1) 感染細胞背上皮内移植 3 週間後

A-d : *Cbfal*(til-1) 感染細胞背上皮内移植 5 週間後

25 B-a : コントロール大腿骨内移植 3 週間後

B-b : コントロール大腿骨内移植 8 週間後

B-c : Cbfal(til-1) 感染細胞大腿骨内移植 3 週間後

B-d : Cbfal(til-1) 感染細胞大腿骨内移植 8 週間後

図 16 は、ラット背上皮移植後のブロックにおけるアルカリフェオスマスター

5 ゼ活性の変化を示すグラフである。

図 17 は、ラット背上皮移植後のブロックにおけるオステオカルシン量の変

化を示すグラフである。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願 2001-227979 号の明細書に

10 記載された内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の具体的な実施例について記載するが、本発明はこれらの
実施例に限定されるものではない。

15

実施例 1： アデノウィルスベクターによるラット骨芽細胞へのCbfal遺伝子導入による骨組織再生

1. 実験方法

1) アデノウィルスベクターの作製

20 ①CbfalのcDNAの調整

CbfalのcDNAは、住友製薬株式会社より提供を受けた2種のプラスミド^{*}
¹； pSG5/IT (mPEBP2aA) 及びpSG5/KS (mtil-1) から、mPEBP2aAのORFは制限酵素BamHIを、mtil-1のORFは制限酵素BglIIを用いて切り出し、TypeI : pebp2
αA/Cbfal (配列番号 1) 、 TypeII/III : til-1/Cbfal (配列番号2) の2種
25 を調整した (図1) 。

* 1 Cbfalは、T細胞特異的に発現しているTypeI (pebp2 α A/Cbfal) と骨芽細胞特異的に発現しているTypeII/III (til-1/Cbfal) があり、TypeII/IIIはTypeIよりも長い。

②組換えアデノウィルスの作製

5 2種のCbfalのcDNAを市販のAdenovirus Cre/loxP Kit (宝酒造社製) を用いてコスミドベクターpAxCALNLwのSwaIサイトに挿入し、キットの説明書に従い組換えアデノウィルスベクターを作製した(図2)。作製したウィルスの力価は、約10¹¹ PFU/mlで、感染効率は非常に高かった。

2) 骨髄細胞の採取及び培養

10 ラット骨芽細胞 (Rat Bone Marrow Osteoblast : RBMO) は、6週齢のFisherラット(オス)の大脚骨よりManiatopoulosらの方法 (Maniatopoulos, C., Sodek, J., and Melcher, A. H. (1988) Cell Tissue Res. 254, 317-330) に従って採取した。

15 採取した細胞を、15%FBS (Sigma社製)、Antibiotic-Antimycotic (GIBCO BRL社製) 添加MEM培地 (nacalai tesque社製) でコンフルエントになるまで培養した。次に、直径3.5cmのディッシュに、5nM デキサメタゾン (Sigma社製)、10mM β -グリセロフォスフェート (Sigma社製)、50 μ g/ml アスコルビン酸フォスフェート (Wako社製) を添加した上述の培地を入れ、1ディッシュあたり細胞が約40万個となるように培養液を加えて継代培養した。翌20日、継代培養したラット骨芽細胞に前項で調整した組換えアデノウィルスベクターをmultiplicity of infection(moi)=500で感染させた。なお、コントロールとして、Cbfal非導入アデノウィルスを感染させた細胞を作製した。

3) Xgal染色法によるLacZ遺伝子発現細胞の観察

25 アデノウィルス感染3日後～2週間後のラット骨芽細胞におけるLacZの発

現をScholerらの方法 (Scholer, H. R. et al., (1989) EMBO J., 8, 2551-2557) に従ってXgal染色法により観察した(図3)。さらに、染色した細胞をNIH imageを用いて画像解析を行い、発現細胞数を数値化することにより遺伝子導入効率を求めた(図4)。

5 4) アルカリリフォスファターゼ活性の測定

アデノウィルス感染3日後～2週間後のラット骨芽細胞を100mM Tris (pH 7.5), 5mM MgCl₂で洗浄後、スクレイパーで集め、500 μlの100mM Tris (pH 7.5), 5mM MgCl₂, 1%TritonX-100 に懸濁して超音波破碎した。破碎後 6,000gで5分間遠心分離して上清を回収した。各上清5 μlを0.056M 2-amin 10 o-2-methyl-1,3-propandiol (pH9.9), 10mM p-nitrophenyl phosphate, 2mM MgCl₂に加え、37°Cで30分間インキュベートした後、すぐにマイクロプロレートリーダーで吸収波長405nmにおける吸光度を測定した。酵素活性は、得られた吸光度からp-ニトロフェノールを用いて作製した検量線に基づいて求めた(図5)。

15 5) カルシウム量の測定

アデノウィルス感染後1～3週間後のラット骨芽細胞を3.7%ホルマリン緩衝液で固定し、一昼夜0.6M HC1で脱灰した。脱灰液を希釈し、市販のo-クレゾールフタレインコンプレキソン含有カルシウム分析試薬(Sigma社製, #587, 360-11)を用い、説明書に従いカルシウム量を測定した(図6)。

20 6) ノーザンハイブリダイゼーション

アデノウィルス感染後のラット骨芽細胞より、市販のTRIzol試薬(GIBCO BRL社製, #15596-10551)を用い、説明書に従いTotal RNAを抽出した。10 μgのTotal RNAを1% アガロース/5.5% ホルムアルデヒドゲルで分離し、20 ×SSCでHybond™-X1 メンブレン(Amersham Pharmacia Biotech社製)に転写した。その後、80°Cで2時間加熱し、UV照射を2分間行った。GAPDHとCbfa1

のcDNAプローブはrediprimeTM (Amersham Pharmacia Biotech社製) を用いて、
α-³²PdCTP (3000Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech社製) でラベルし、
取り込まれなかつた α-³²PdCTPをMicroSpinTM G-25 Column (Amersham
Pharmacia Biotech社製) を用いて除いた。このメンブレンを68℃で30分間
5 PerfectHybTM Plus HYBRIDIZATION BUFFER (SIGMA社製) 中でインキュベー
トした後、ラベルしたcDNAプローブ (2×10^6 cpm/ml) を加えてさらに68℃で1
時間インキュベートした。メンブレンは室温で2xSSC/0.1% SDSで5分間洗つ
た後、さらに68℃で0.5xSSC/0.1% SDSで2回各20分間洗つた。その後メンブ
レンを-80℃でKodak XAR filmに一昼夜感光した (図7)。

10 7) 細胞数の計測

アデノウィルス感染後3日～2週間後の骨芽細胞を1%グルタルアルデヒド
添加PBSで5分間固定した後、蒸留水で2回洗浄し、1%クリスタルバイオレット
を用いて30分間室温で染色した。蒸留水で3回洗つて余分な染料を除いた
後、10% 酢酸、1% TritonX-100で脱色した。脱色液を希釈し、波長595nmに
15 おける吸光度を測定した。細胞数は、得られた吸光度から検量線^{*2}に基づ
き決定した (図8)。

*2 検量線は細胞を適当な濃度で播種し (duplicate)、上述の染色法とトリ
プシン処理して剥がした細胞をカウントすることにより作製した。

8) 石灰化の観察

20 骨芽細胞が分泌するミネラル成分による石灰化の様子をvon kossa染色
法及びアリザリンレッド染色を用いて観察した。

①von kossa染色

アデノウィルス感染1～3週間後の骨芽細胞を3.7%ホルマリン緩衝液で5
分間固定し、蒸留水で軽く洗い、5%硝酸銀水溶液を加えて20分間暗所でイ
ンキュベートした。その後明所でさらに15分間インキュベートし、蒸留水

で何度も洗浄した。結果をスキャナーで取り込んで比較した(図9)。

②アリザリンレッド染色

5 繼代培養後、骨芽細胞にCbfa1とCreリコンビナーゼ遺伝子の組換えアデノウィルスをmultiplicity of infection(moi)=500で感染させた。感染1～3週間後の骨芽細胞を3.7%ホルマリン緩衝液で5分間固定し、蒸留水で軽く洗い1%アリザリンレッド水溶液を加えて2分間インキュベートした。その後蒸留水で何度も洗浄し、結果をスキャナーで取り込んで比較した(図10)。

2. 実験結果

10 1) LacZ遺伝子の発現

図3及び図4から明らかなように、LacZ遺伝子の発現は、感染後3日目でピークに達し、約90%の細胞がLacZ遺伝子を発現していた。その後徐々に発現細胞数は減少するが、感染後2週間を経過しても一部の細胞(約20%)では発現が維持されていた。

15 2) アルカリリフォスマターゼ活性

図5から明らかなように、Cbfa1(pebp2 α A, til-1)を過剰発現させた細胞のアルカリリフォスマターゼ活性はコントロールに比較して高く、特に感染後10日目の酵素活性はコントロールの約6倍に達した。

3) カルシウム量

20 図6から明らかなように、Cbfa1(pebp2 α A, til-1)過剰発現細胞の方が圧倒的にカルシウムの沈着量が多いことが確認された。

4) Cbfa1遺伝子の発現

25 図7から明らかなように、Cbfa1(pebp2 α A, til-1)組換えアデノウィルス感染細胞では、感染後3日目の細胞で非常に高いCbfa1遺伝子発現が認められた。またtil-1に関しては内在性のCbfa1遺伝子の発現も観察することが

できた。

5) 細胞の増殖

図8から明らかなように、非感染細胞(コントロール)に比べてCbfal+Cre遺伝子を導入した細胞はウィルス価は倍であるが、細胞の増殖はほとんど差がなかった。

6) 石灰化

von kossa染色(図9)とアリザリンレッド染色(図10)の結果から明らかなように、Cbfal(pebp2 α A, t11-1)過剰発現細胞の方が石灰化が進んでいることが確認された。

10

3. 結論

以上の結果より、CbfalのcDNAはアデノウィルスベクターにより極めて効率良く骨芽細胞に導入され、導入されたCbfal遺伝子は骨芽細胞の骨組織への分化を顕著に促すことが確認された。また、この培養系は多孔性セラミックス等の適当な足場材料を用いることで、生体外での効率よい組織再生手段を提供しうることが示された。

実施例2： Cbfal遺伝子導入骨芽細胞のラット背上皮皮下移植実験

1. 実験方法

20 1) ラット背上皮皮下移植

市販の β -TCP(リン酸三カルシウム)多孔性ブロック(Olympus社製、平均ポアサイズ=直径200 μ m, 5mmx5mmx5mm)を足場として、以下の方法でCbfal遺伝子導入ラット骨芽細胞を培養し、ラット背上皮に皮下移植した。すなわち、コンフルエントになったラット骨芽細胞をトリプシン処理して25剥がした後、 β -TCPブロックに細胞濃度100万個/mlで減圧下(100mHg)で吸

着させた。さらに2週間培養した後、実施例1で作製したCbfa1(til-1)導入アデノウィルスベクターをmoi=500で感染させ、翌日ラットの背上皮皮下に移植した。コントロールとして、Cbfa1非導入アデノウィルスベクターを感染させた細胞を含むブロックを同様に移植した。ブロックは移植2週間後、
5 4週間後及び8週間後に摘出し、各種測定及び観察を行った。

2) 組織切片観察（ヘマトキシリン／エオジン染色）

摘出したブロックを4%パラホルムアルデヒド、0.05%グルタルアルデヒドでマイクロウェーブ固定した後、翌日10%EDTA、100mM Tris (pH7.4) 中で約1週間脱灰した。脱灰後、エタノールで脱水し、パラフィンに包埋した。5
10 μm の厚さで切片を作製し、脱パラフィン後、ヘマトキシリン続いてエオジンで染色した（図11, 12）。

3) アルカリリフォスファターゼ活性の測定

摘出したブロックを、実施例1と同様の方法でアルカリリフォスファターゼ活性を測定した（図13）。

15 4) オステオカルシン量の測定

アルカリリフォスファターゼ活性測定後のブロックの残渣を20%ギ酸存在下で超音波破碎し、4日間4°Cでインキュベートして脱灰した。PD-10カラム(Amersham Pharmacia Biotech社製)で脱塩した後、10%EDTA、100mM Tris (pH7.4) で抽出し、RAT OSTEOCALCIN EIA KIT (Biomedical Technologies Inc. 製) でオステオカルシン量を測定した（図14）。

2. 実験結果

1) ヘマトキシリン／エオジン染色

移植ブロックのヘマトキシリン／エオジン染色の結果（図11、12）から、
25 Cbfa1(til-1)を過剰発現させた細胞の方がブロックのポアに存在する細胞

数が多く、骨化した部位が大きく広がっていることが確認された。

2) アルカリリフォスファターゼ活性

図13から明らかなように、*Cbfal(til-1)*を過剰発現させた細胞のアルカリリフォスファターゼ活性の方がコントロールよりも高く、特に移植後4週間
5 目の酵素活性はコントロールの約3倍に達した。

3) オステオカルシン量

図14から明らかなように、*Cbfal(til-1)*を過剰発現させた細胞のオステオカルシン量の方がコントロールよりも高く、特に移植後4週間目のオステオカルシン量はコントロールの約2.5倍に達した。

10

実施例3： *Cbfal*遺伝子導入骨芽細胞の皮下及び骨欠損部移植実験

1. 実験方法

1) ラット背上皮及び大腿骨内への移植

実施例2と同様に、ラット骨芽細胞を市販の β -TCPブロック(Olympus社
15 製、平均ポアサイズ:直径200 μ m, 5mmx5mmx5mm(皮下移植用)、2mmx2mmx2mm
(骨欠損部移植用))に細胞濃度200万個/mlで吸着させた。24時間後、
*Cbfal(til-1)*導入アデノウィルスベクターをmoi=500で感染させ、翌日ラッ
トの背上皮皮下及び骨欠損部に移植した。骨欠損部への移植は、左右大腿
骨末端前頭部に直径2mm、深さ3-4mmの穴を開け、この穴(骨欠損部)にブ
20 ロックを埋入した。コントロールとして、*Cbfal*非導入アデノウィルスベク
ターを感染させた細胞を含むブロックを同様に移植した。

皮下移植したブロックは移植3週間後又は5週間後に摘出し、
アルカリリフォスファターゼ活性及びオステオカルシン量の測定及び組織切
片の観察を行った。また、大腿骨内に移植したブロックは移植3週間後又は
25 8週間後に摘出し、組織切片の観察を行った。

2. 実験結果

1) ヘマトキシリン/エオジン染色

皮下移植：

5 移植3週間目及び5週間目のいずれにおいても、*Cbfal(til-1)* を過剰発現させた細胞の方がブロックのポアに存在する細胞数が多く、骨化がより進行していることが確認された（図15A）。

骨欠損部移植：

移植3週間目では、*Cbfal(til-1)* を過剰発現させた細胞では骨形成が進み、
10 大腿骨切開部分はほぼ完全に新しい骨組織に置換されていたが、コントロールではほとんど骨形成がみられなかった。また、移植8週間目では、*Cbfal(til-1)* を過剰発現させた細胞では、さらに骨形成が進み、ブロックを移植した穴はほぼ完全に骨髄組織に置換されていたが、コントロールでは移植ブロックがまだ残っていた（図15B）。

15 2) アルカリフосфатаз活性及びオステオカルシン量

Cbfal(til-1) を過剰発現させた細胞のアルカリフосфатаз活性は、移植後3週間目でコントロールの約2.0倍、5週間目で約4.7倍であった（図16）。また、*Cbfal(til-1)* を過剰発現させた細胞のオステオカルシン量は、移植後3週間目でコントロールの約2.0倍、5週間目で約1.5倍であった（図
20 17）。

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

25 産業上の利用の可能性

本発明によれば、骨髓細胞を利用した骨・軟骨組織再生において、効率のよい生体外組織培養を行うことができる。かかる方法は、生体内では再生不可能な損傷組織に対し、生体から取り出した自己の細胞を *in vitro* で培養・組織化し、限りなく生体に近い組織を再構築して生体内に戻すと
5 いう、究極的治療を可能にする。

請　求　の　範　囲

1. 骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を単離された細胞に導入し、該細胞を分化増殖させる工程を含む、骨・軟骨組織の作製方法。
- 5 2. 前記細胞が骨髓由来細胞である、請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 前記骨髓由来細胞が間葉系幹細胞である、請求の範囲第2項に記載の方法。
4. 前記骨髓由来細胞が骨芽細胞である、請求の範囲第2項に記載の方法。
5. 前記細胞が初代培養細胞である、請求の範囲第1項～第4項のいずれか1項に記載の方法。
- 10 6. 前記細胞が患者から単離された細胞である、請求の範囲第5項に記載の方法。
7. 前記骨・軟骨誘導性転写因子が、Cbfa1、Dlx-5、Bapx1、Msx2、Scleraxis 及びSox-9 からなる群より選ばれる1種又は2種以上である、請求の範囲第1項～第6項のいずれか1項に記載の方法。
- 15 8. 骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子の細胞への導入がアデノウィルスベクター又はレトロウィルスベクターを用いて行われる、請求の範囲第1項～第7項のいずれか1項に記載の方法。
9. 骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を導入した細胞の増殖が、多孔性セラミックス、コラーゲン、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、ならびにこれら複合体からなる群より選ばれる1種又は2種以上を足場として行われる、請求の範囲第1項～第8項のいずれか1項に記載の方法。
- 20 10. 以下の工程を含む、骨・軟骨組織の作製方法。
 - 1) 生体から単離した骨髓由来細胞をデキサメタゾン、免疫抑制剤、

骨形成タンパク質及び骨形成液性因子からなる群より選ばれる 1 種又は 2 種以上によって分化誘導する工程。

2) 上記細胞に骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子をアデノウィルスベクター又はレトロウィルスベクターを用いてトランスフェクトする工程。
5

3) 上記細胞を多孔性セラミックス、コラーゲン、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、ならびにこれらの複合体からなる群より選ばれる 1 種又は 2 種以上を足場として増殖させる工程。

11. 請求の範囲第 1 項～第 10 項のいずれか 1 項に記載の方法によつ
10 て作製された骨・軟骨組織を含む、インプラント。

12. さらに、多孔性セラミックス、コラーゲン、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、ならびにこれらの複合体からなる群より選ばれる 1 種又は 2 種以上の足場材料を含む、請求の範囲第 11 項記載のインプラント。

15 13. 骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を導入した細胞を含む、多孔性セラミックス、コラーゲン、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、ならびにこれらの複合体からなる群より選ばれる 1 種又は 2 種以上を含む、インプラント。

図 1

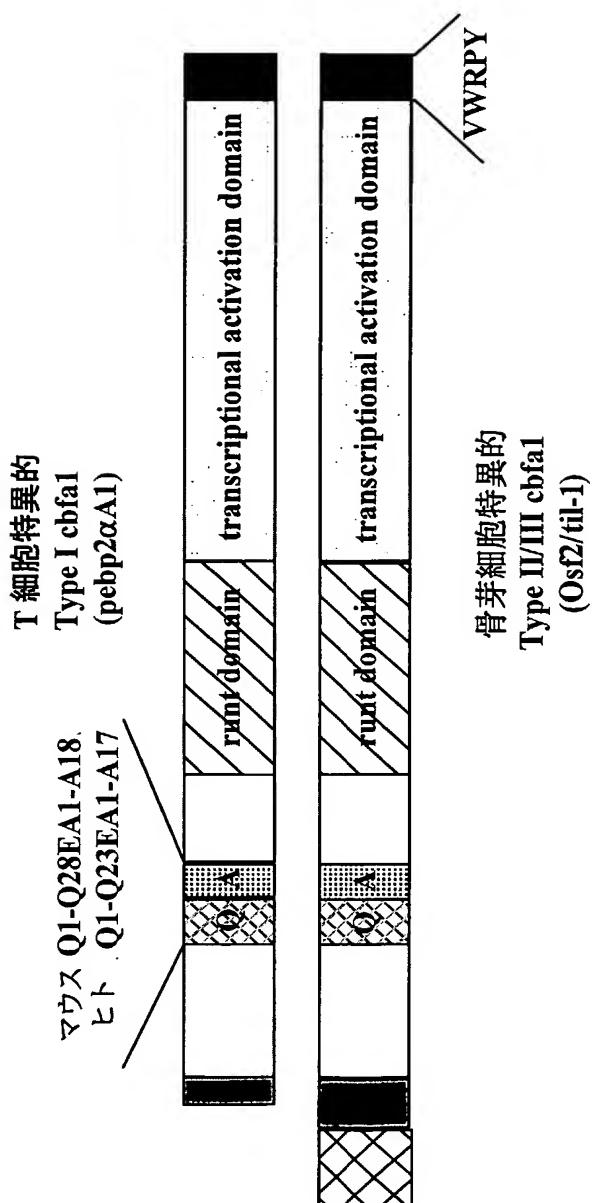


図 2

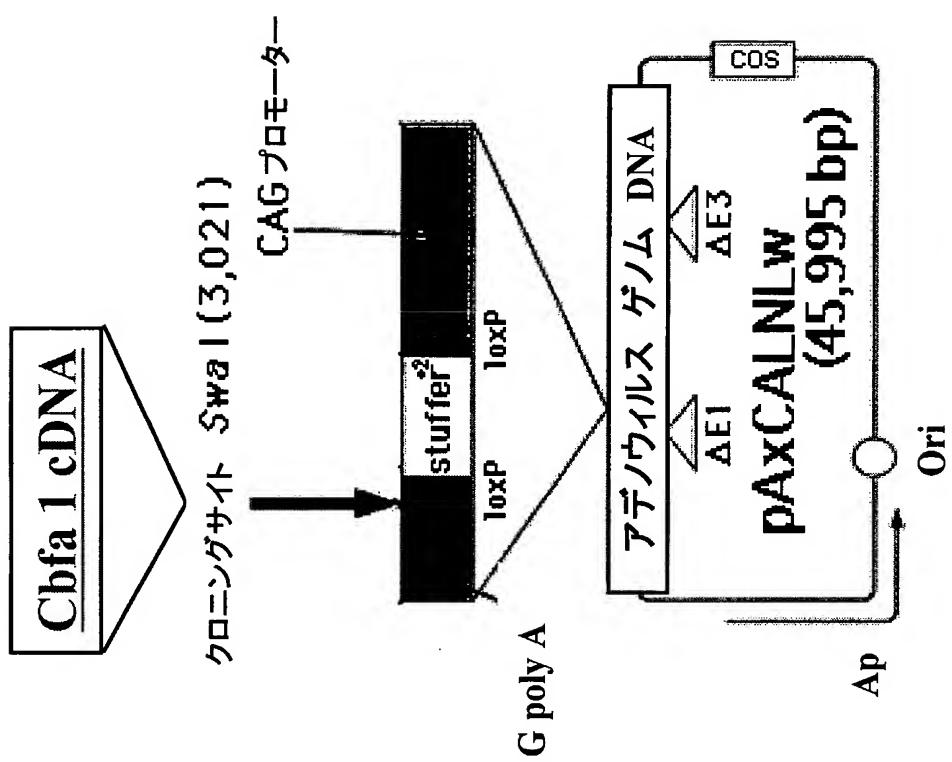


図 3

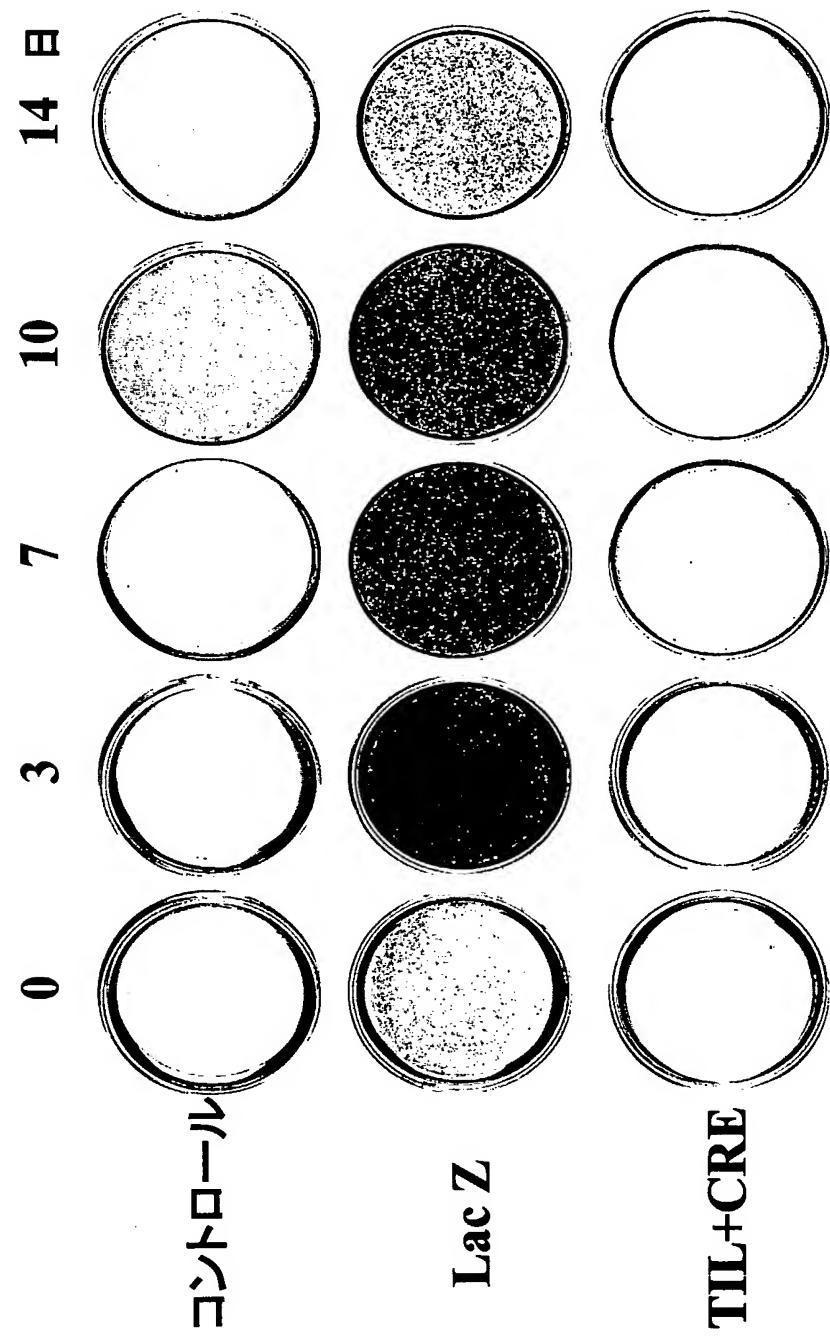


図 4

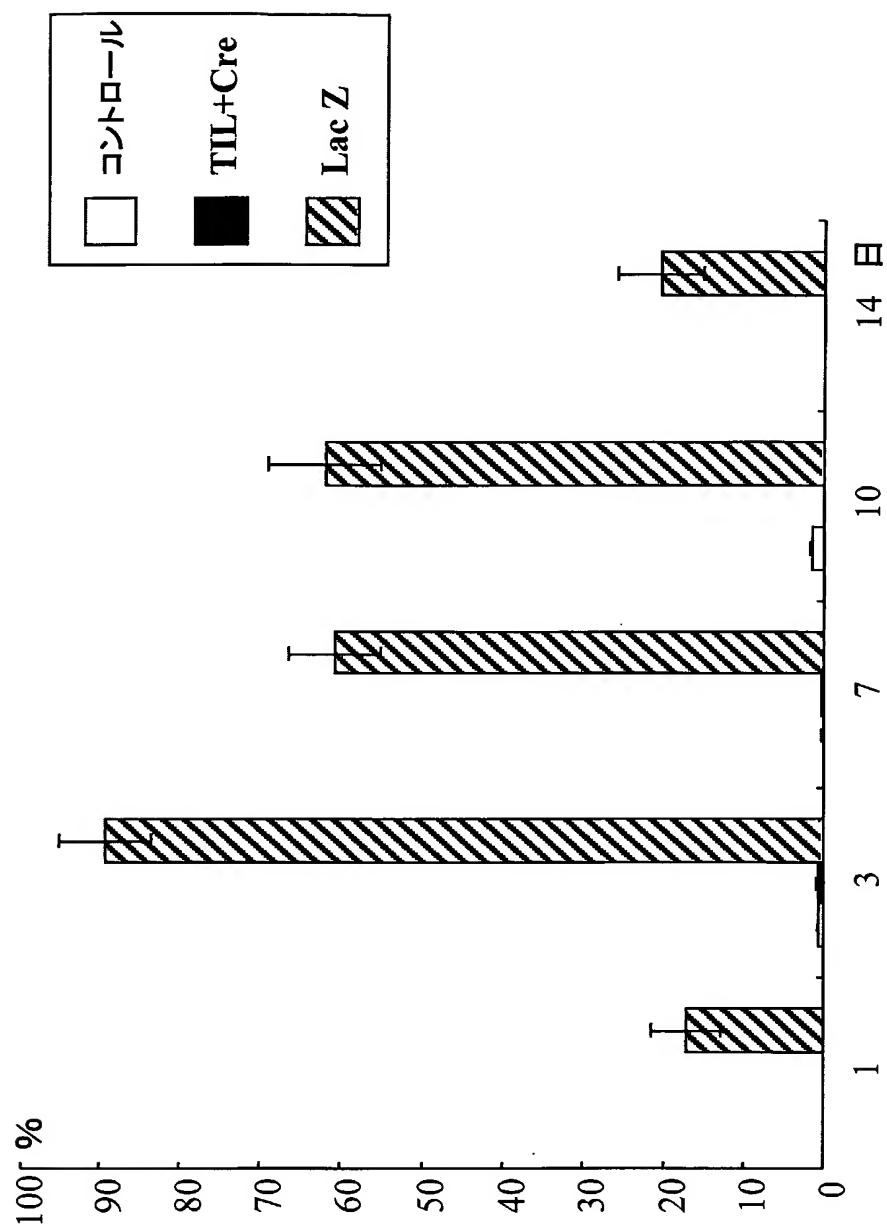


図 5

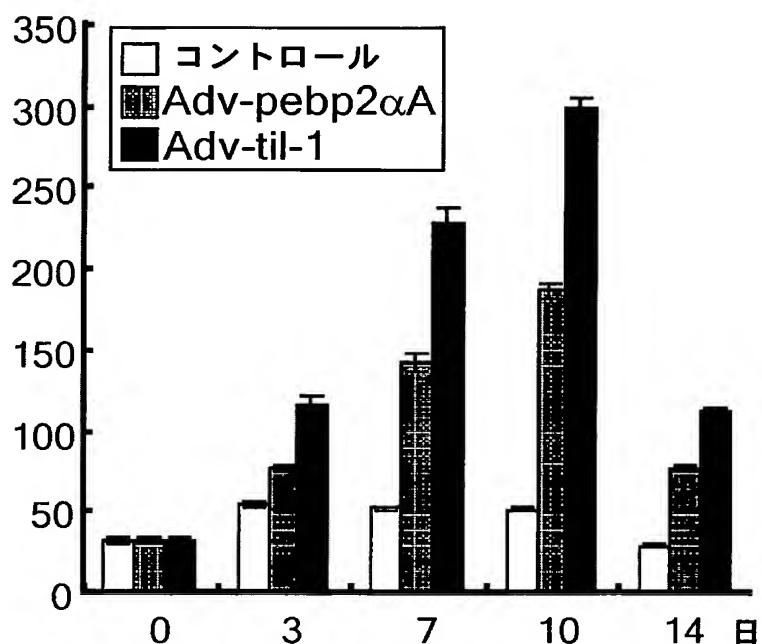
(mM/ 10^4 cells)

図 6

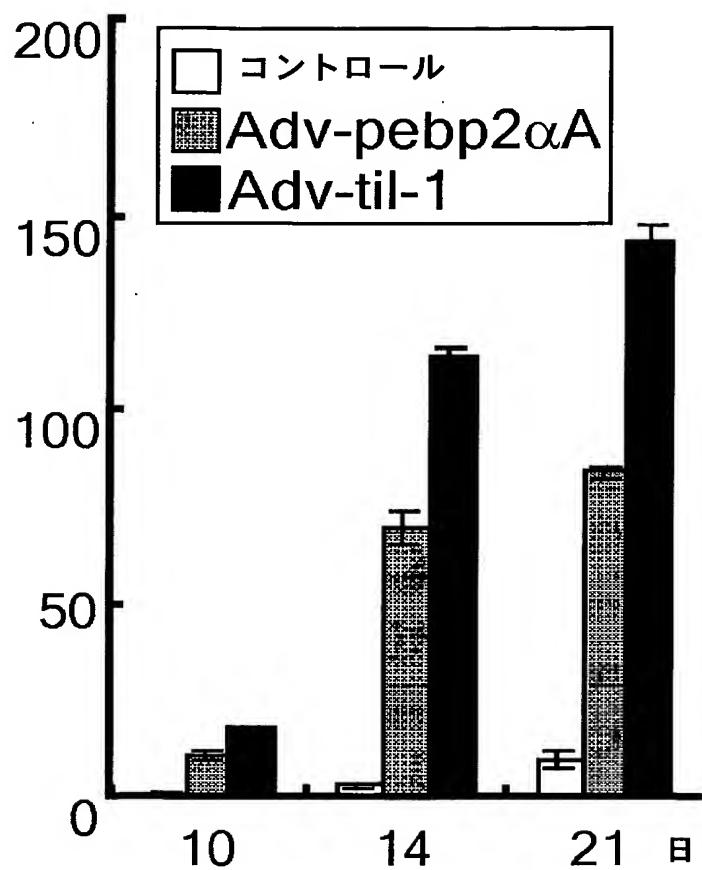
(m g / ϕ 3.5cm dish)

図 7

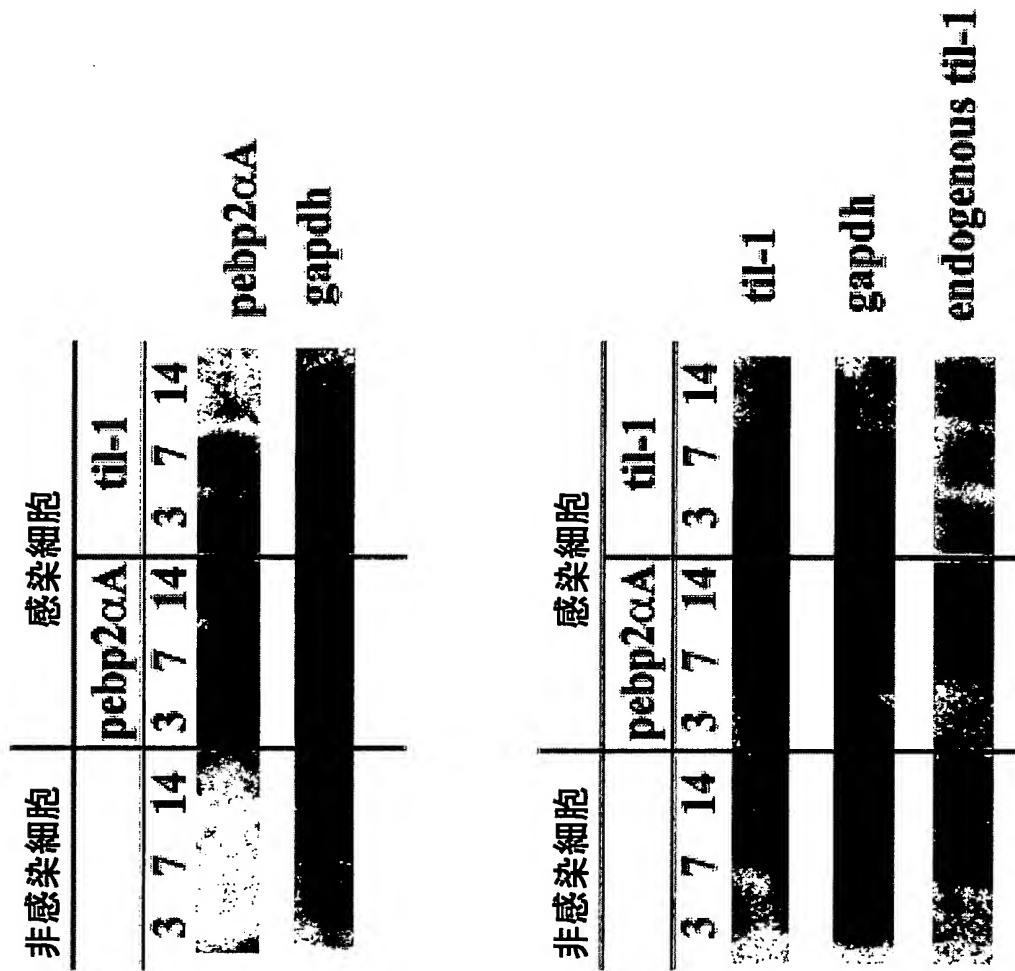


図 8

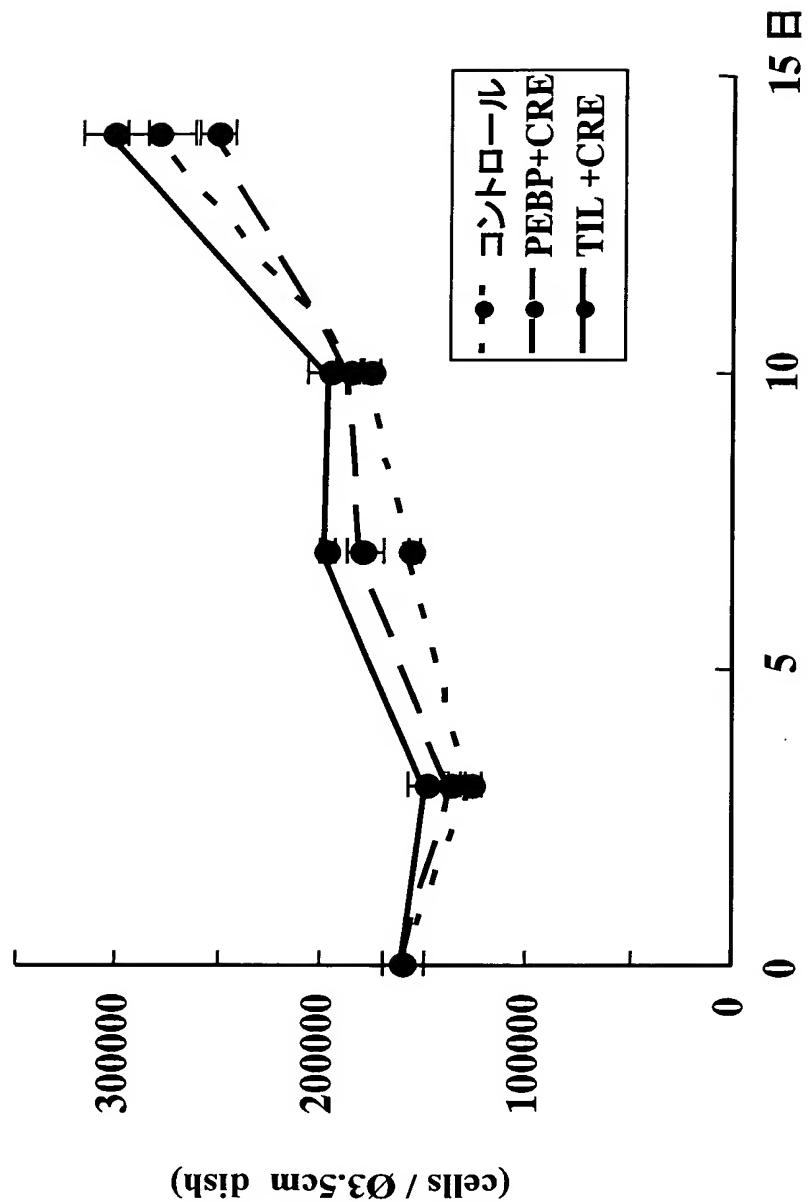


図 9

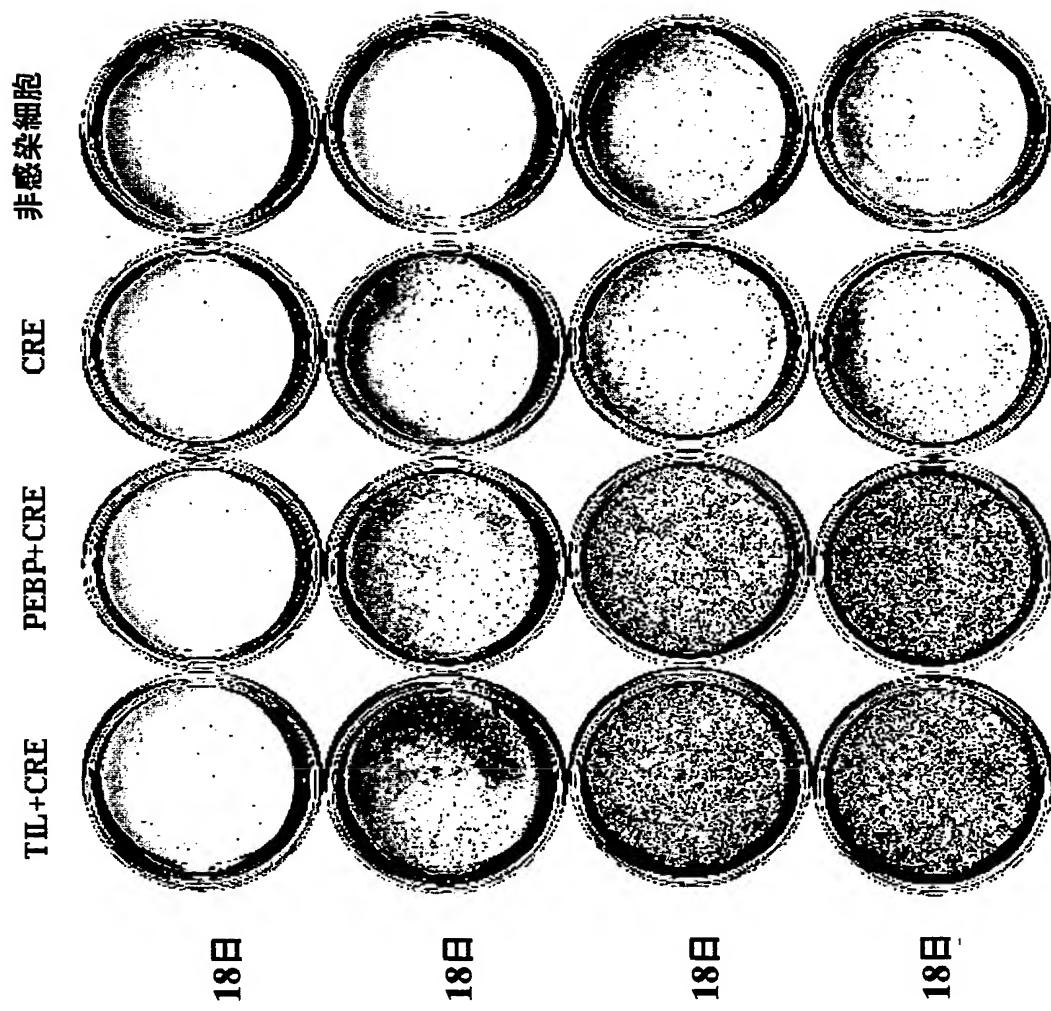


図 10

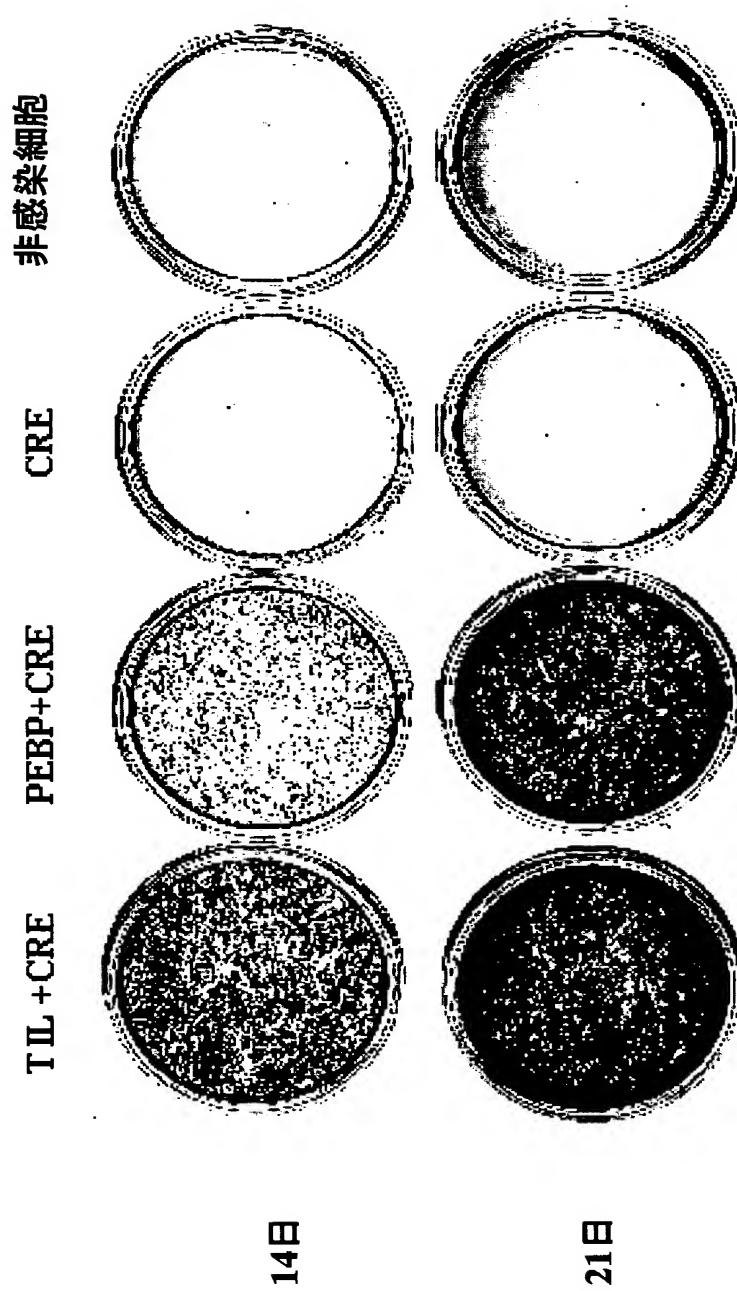


図 1 1

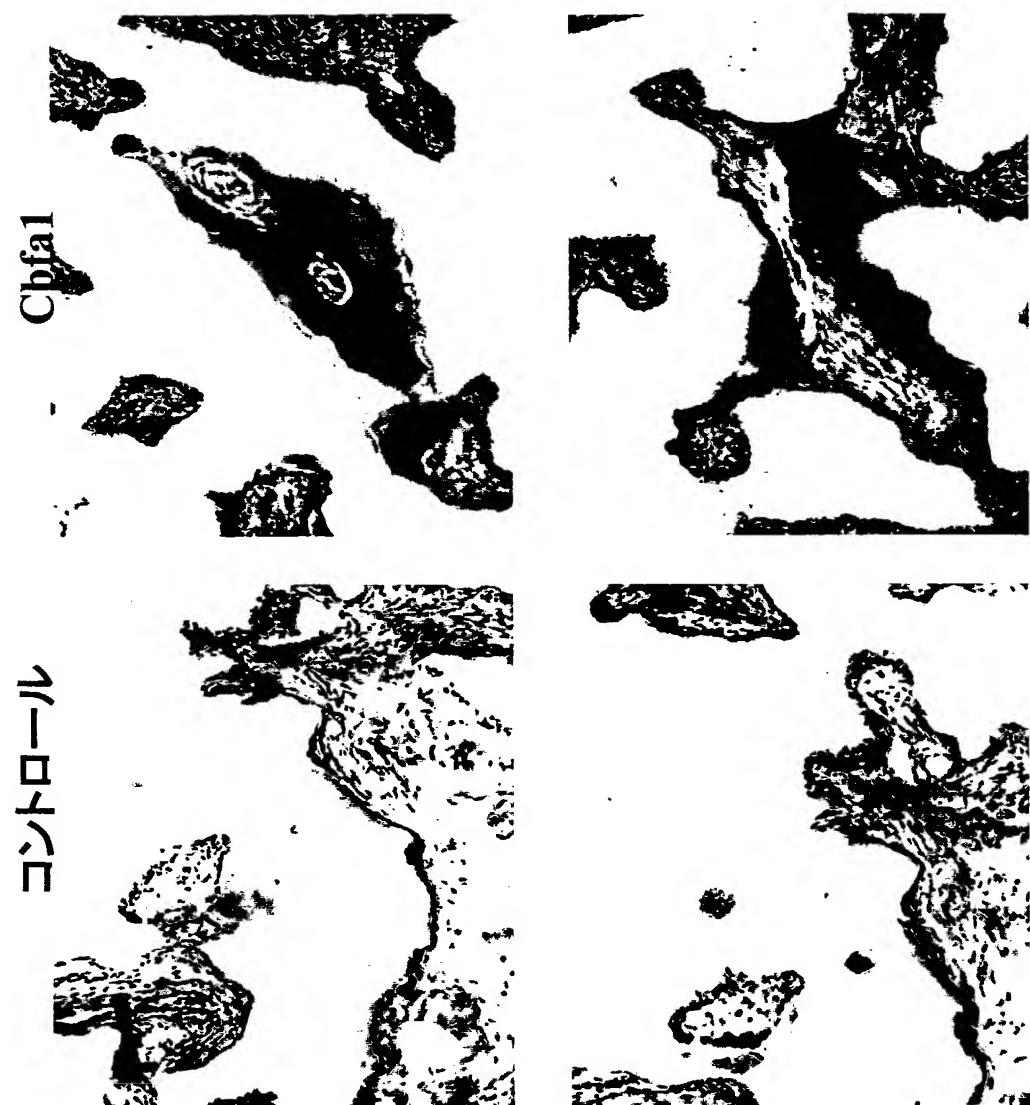


図 1 2

コントロール

*Cbfal*

図 1 3

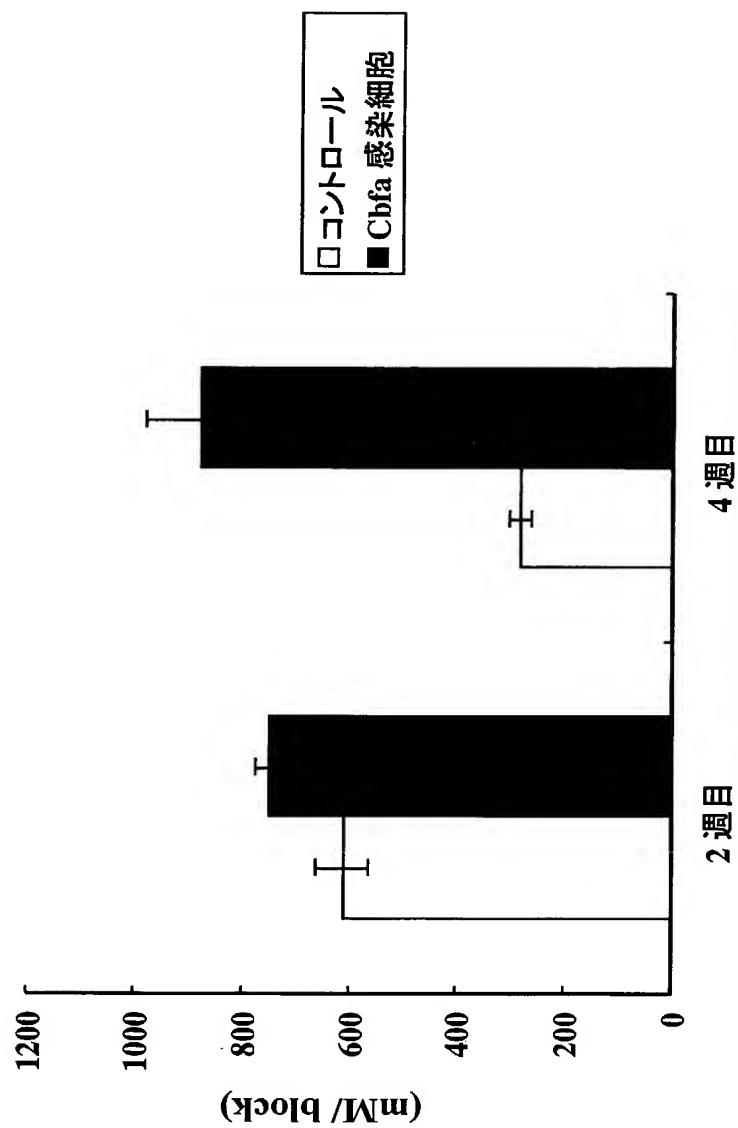


図 1 4

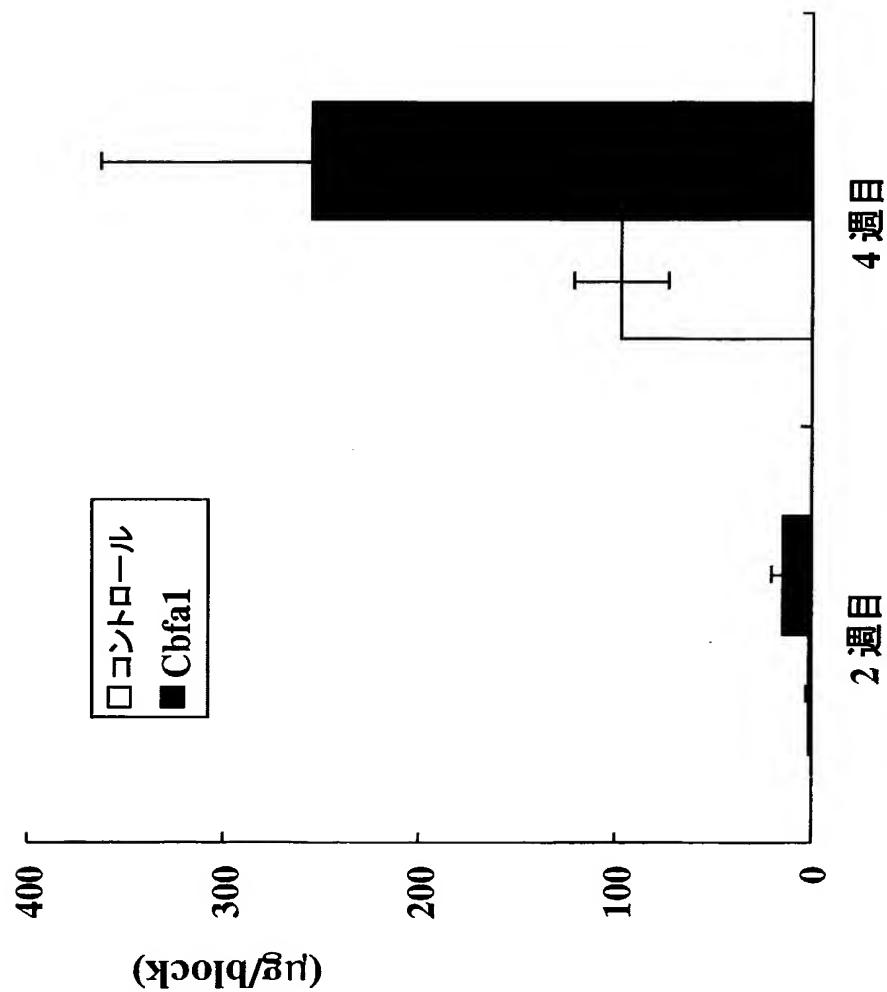


図 15

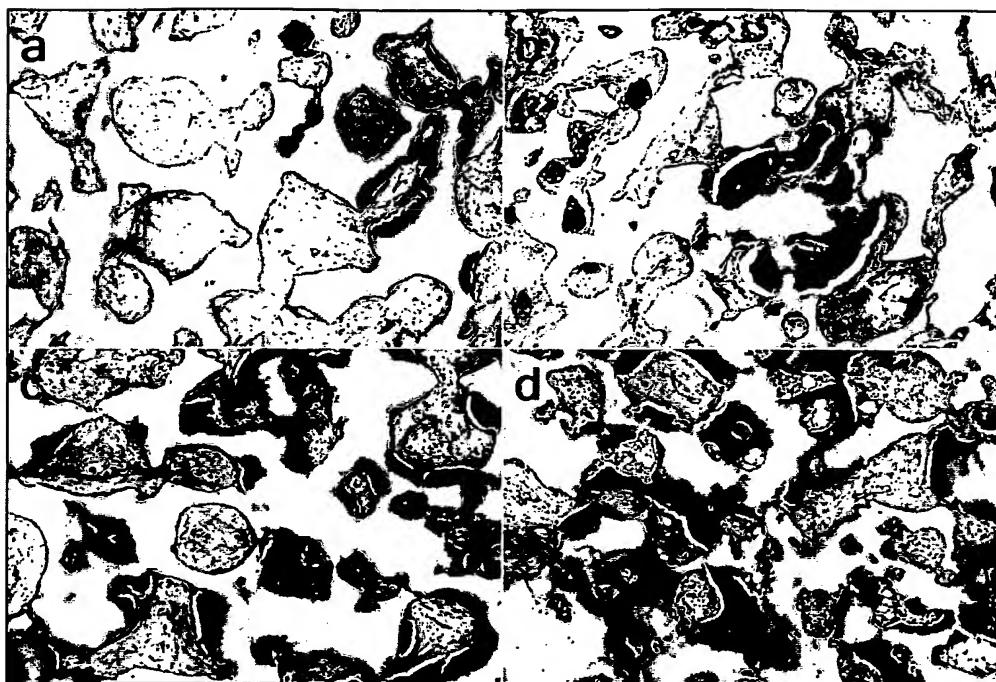
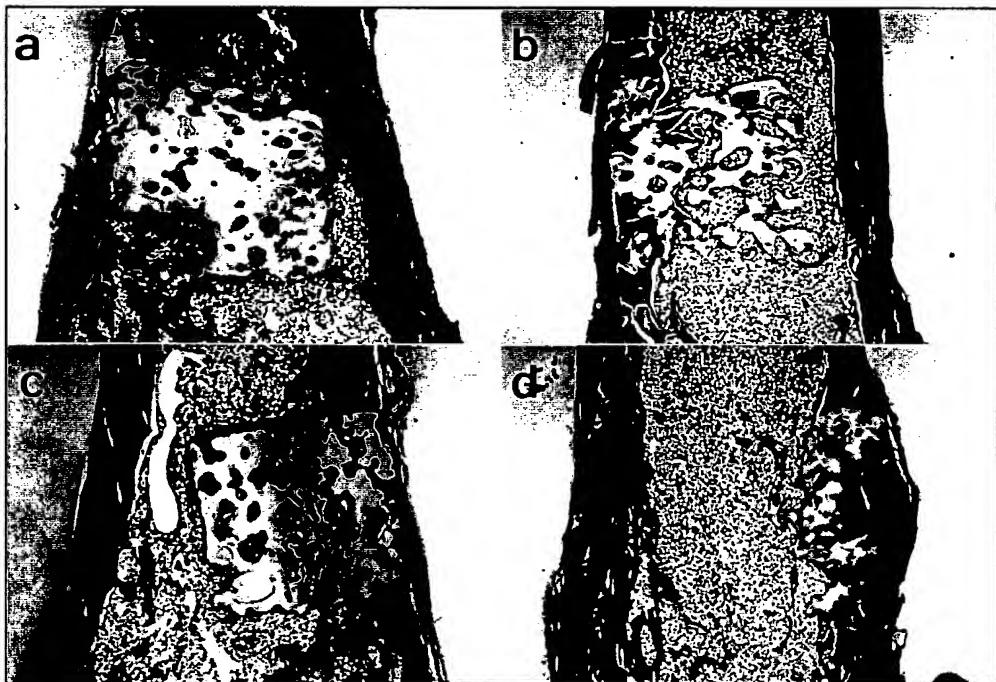
A**B**

図 1 6

($\mu\text{g} / \text{block}$)

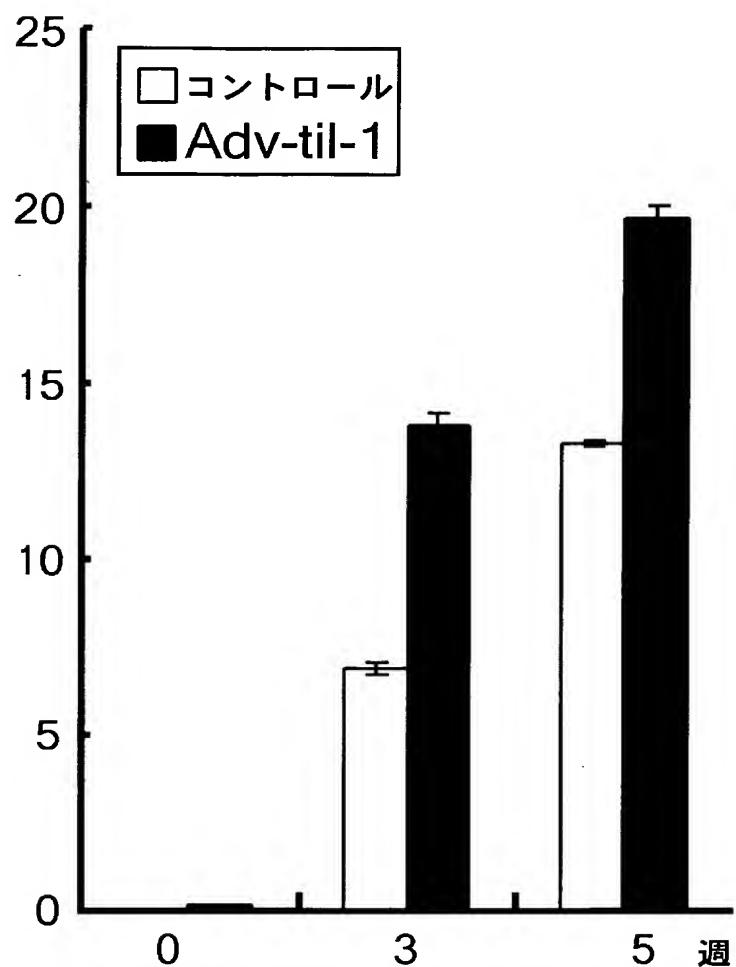
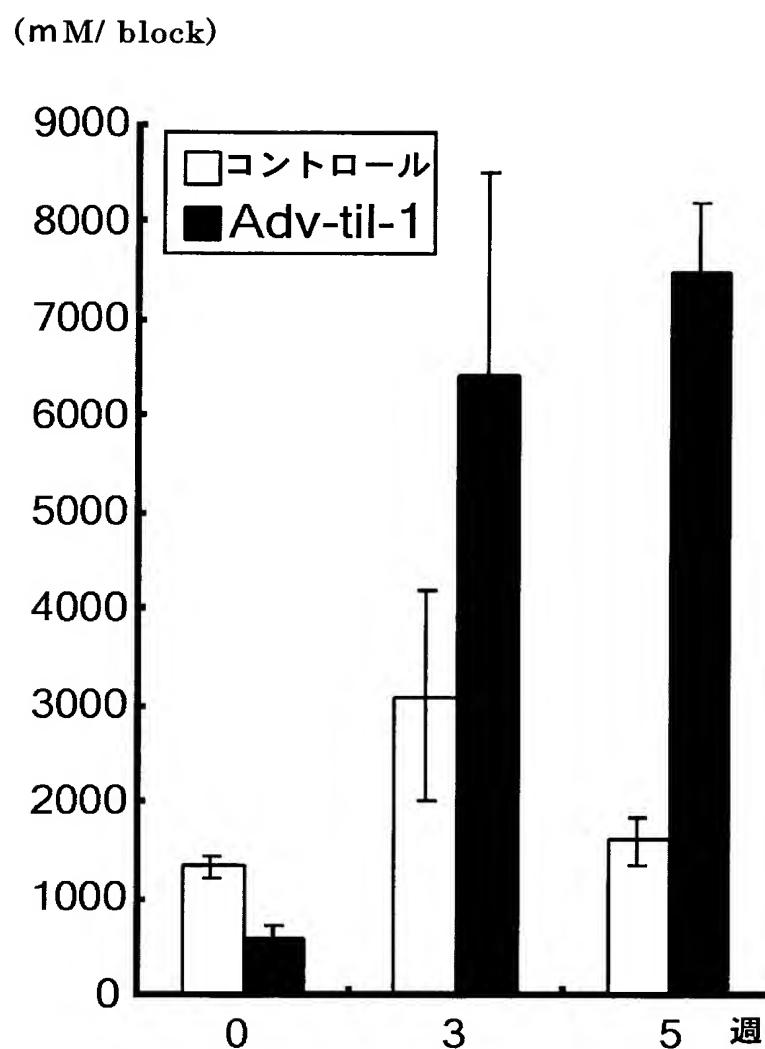


図 17



SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
Japan Science and Technology Corporation

<120> Method for regeneration of bone/cartilage tissue by using gene transmission of transcription factors

<130> PH-1480-PCT

<150> JP2001-227979

<151> 2001-07-27

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1557

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<400> 1

ggatccacca tgcgtattcc tgttagatccg agcaccagcc ggcgcttcag cccccctcc 60
agcagcctgc agcccgcaa gatgagcgac gtgagccgg tggtggtgc gcagcagcag 120
caacagcagc agcagcaaca gcagcagcaa caacagcaac agcaacaaca gcagcagcag 180
cagcagcagc agcaggaggc ggccgcagca gcagcggcgg cagcggcggc ggcagcagcg 240
cgccggccg cagtccccg attgaggccg ccgcacgaca accgcaccat ggtggagatc 300
atcgccggacc acccgccga actggtccgc accgacagtc ccaacttcct gtgtccgtg 360
ctgccctcgc actggcggtg caacaagacc ctgcccgtgg cttcaaggt tgtagccctc 420
ggagaggtac cagatggac tgtggttacc gtcatggccg ggaatgatga gaactactcc 480
gccgagctcc gaaatgcctc cgctgttatg aaaaaccaag tagccaggtt caacgatctg 540
agatttgtgg gccggagcgg acgaggcaag agttcacct tgaccataac agtcttcaca 600
aatcctcccc aagtggccac ttaccacaga gctattaaag tgacagtgga cggccccgg 660
gaaccaagaa ggcacagaca gaagcttgat gactctaaac ctagttgtt ctctgatcgc 720
ctcagtgatt tagggcgcat tcctcatccc agtatgagag tagtgtccc gcctcagaac 780
ccacggccct ccctgaactc tgacccaagt ccttttaatc cacaaggaca gagtcagatt 840
acagatccca ggcaggcaca gtctccccca ccgtggtcct atgaccagtc ttaccctcc 900
tatctgagcc agatgacatc cccatccatc cactccacca cgccgctgtc ttccacacgg 960
ggcaccgggc tacctgccat cactgacgtg cccaggcgta tttcagatga tgacactgcc 1020
acctctgact tctgcctctg gccttcctct ctcagtaaga agagccaggc aggtgcttca 1080
gaactggcc cttttcaga ccccaggcag ttcccaagca tttcatccct cactgagagc 1140
cgcttctcca acccacgaat gcactaccca gccacctta cctacacccc gccagtcacg 1200
tcaggcatgt ccctcgcat gtccgcccacc actcactacc acacgtacct gccaccaccc 1260
taccccggt cttcccaaag ccagagtgga cccttcaga ccagcagcac tccatatctc 1320

tactatggta cttcgtcagc atcctatatcg ttcccaatgg tacccggggg agaccggtct 1380
ccttccagga tggtcccacc atgcaccacc acctcgaatg gcagcacgct attaaatcca 1440
aatttgccta accagaatga tggtggtgac gctgacggaa gccacagcag ttcccccaact 1500
gttttgaatt ctagcggcag aatggatgag tctgtttggc ggccatattg aggatcc 1557

<210> 2

<211> 1804

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<400> 2

agatctccat gcttcattcg cctcacaaac aaccacagaa ccacaagtgc ggtgcaaact 60
ttctccagga agactgcaag aaggctctgg cgtttaatg gttaatctct gcaggtcact 120
accagccacc gagaccaacc gagtcattta aggctgcaag cagtatttac aacagagggc 180
acaagttcta tctggaaaaaa aaaggaggga ctatggcgtc aaacagcctc ttcagcgcag 240
tgacaccgtg tcagcaaagc ttctttggg atccgagcac cagccggcgc ttcagcccc 300
cctccagcag cctgcagccc ggcaagatga gcgacgtgag cccggtggtg gctgcgcagc 360
agcagcaaca gcagcagcag cagcagcaac agcagcagca acaacagcaa cagcaacaac 420
agcagcagca gcagcagcag caggaggcgg ccgcagcagc agcggcggca gcgccggcgg 480
cagcagcggc ggcggccgca gtgccccat tgaggccgcc gcacgacaac cgcaccatgg 540

tggagatcat cgccgaccac ccggccgaac tggccgcac cgacagtccc aacttcctgt 600
gctccgtgct gccctcgac tggcggtgca acaagaccct gcccgtggcc ttcaaggttg 660
tagccctcgg agaggatcca gatgggactg tggttaccgt catggccggg aatgatgaga 720
actactccgc cgagctccga aatgcctccg ctgttatgaa aaaccaagta gccaggttca 780
acgatctgag atttgtggc cggagcggac gaggcaagag tttcaccttg accataacag 840
tcttcacaaa tcctccccaa gtggccactt accacagagc tattaaagtg acagtggacg 900
gtccccggga accaagaagg cacagacaga agcttgatga ctctaaacct agtttgttct 960
ctgatgcct cagtgattt gggcgcattc ctcatcccag tatgagagta ggtgtccgc 1020
ctcagaaccc acggccctcc ctgaactctg caccaagtcc tttaatcca caaggacaga 1080
gtcagattac agatcccagg caggcacagt ctccccacc gtggtcctat gaccagtctt 1140
acccctccta tctgagccag atgacatccc catccatcca ctccaccacg ccgctgtctt 1200
ccacacgggg caccgggcta cctgccatca ctgacgtgcc caggcgatt tcagatgatg 1260
acactgccac ctctgacttc tgcctctggc cttcctctct cagtaagaag agccaggcag 1320
gtgcttcaga actggccct tttcagacc ccaggcagtt cccaagcatt tcatccctca 1380
ctgagagccg cttctccaac ccacgaatgc actacccagc caccttacc tacacccgc 1440
cagtcacgtc aggcattgtcc ctggcatgt ccgccaccac tcactaccac acgtacactgc 1500
caccacccta cccggctct tcccaaagcc agagtggacc cttccagacc agcagcactc 1560
catatctcta ctatggtaact tgcgtcagcat cctatcgtt cccaatggta cccgggggag 1620
accggctcc ttccaggatg gtcccaccat gcaccaccac ctcgaatggc agcacgctat 1680
taaatccaaa tttgcctaac cagaatgatg gtgttgacgc tgacggaagc cacagcagtt 1740
cccccaactgt tttgaattct agcggcagaa tggatgagtc tgtttggcgg ccatatttag 1800
atct 1804

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06727

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K48/00, 38/18, 45/00, 35/12, 35/32, A61L27/00,
A61P19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K48/00, 38/00-58, 45/00, 35/12, 35/32, A61L27/00,
A61P19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), REGISTRY (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WEI, D. et al., Adenovirus-mediated expression of Cbfal/Runx2 in C3H10T1/2 mesenchymal cells induces mineralization and expression of some, but not all osteoblast markers, Journal of Bone and Mineral Research, 2001.09, Vol.16, Suppl1, p.S488, full text	11-13
Y	UETA, Chisato et al., Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfal or its dominant negative form in chondrocyte, Journal of Cell Biology, 2001.04, Vol.153, No.1, pages 87 to 99, full text; particularly, page 87, abstract; Fig. 8	11-13

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
29 August, 2002 (29.08.02)Date of mailing of the international search report
08 October, 2002 (08.10.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06727

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ENOMOTO, Hirayuki et al., Cbfal is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation, Journal of Biological Chemistry, 2000, Vol.275, No.12, pages 8695 to 8702, full text; particularly, page 8695, abstract; Figs. 7, 8	11-13
Y	Toshifumi KOMORI, "Hone Keisei no Master Regulator Pebp2 α A/Cbfal, Protein, Nucleic acid and Enzyme, 2000, Vol.45, No.1, pages 13 to 17, full text; particularly, page 15, left column, lines 19 to 29	11-13
Y	US 6077987 A (North Shore-Long Island Jewish Research Institute), 20 June, 2000 (20.06.00), Full text; particularly, Claims 1 to 9, abstract; column 8, line 60 to column 9, line 14 (Family: none)	11-13
Y	Takaaki YOSHIKAWA, "Baiyo Hone Ishoku ni yoru Hone Saisei-Baiyo Kotsuzui Saibo ni yoru Tissue Engineering", 2000, Protein, Nucleic acid and Enzyme, Vol.45, No.13, pages 2289 to 2296, full text; particularly, page 2290, left column, lines 6 to 9	11-13
Y	WO 98/30234 A (IWAMOTO, Masahiro), 16 July, 1998 (16.07.98), Full text; particularly, page 1, lines 6 to 18 & JP 10-194987 A	11-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06727

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 1–10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1 to 10 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(I P C))

Int. Cl⁷ A61K48/00, 38/18, 45/00, 35/12, 35/32, A61L27/00, A61P19/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(I P C))

Int. Cl⁷ A61K48/00, 38/00-58, 45/00, 35/12, 35/32, A61L27/00, A61P19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2002年
 日本国登録実用新案公報 1994-2002年
 日本国実用新案登録公報 1996-2002年

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN) BIOSIS(STN)
 REGISTRY(STN) EMBASE(STN).
 MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P A	WEI, D. et al, Adenovirus-mediated expression of Cbfal/Runx2 in C3H10T1/2 mesenchymal cells induces mineralization and expression of some, but not all osteoblast markers, Journal of Bone and Mineral Research, 2001.09, Vol. 16, Suppl1, pS488 全文	11-13
Y	UETA, Chisato et al, Skeletal malformations caused by over-expression of Cbfal or its dominant negative form in chondrocyte, Journal of Cell Biology, 2001.04, Vol. 153, No. 1, pp87-99, 全文, 特に第87頁ABSTRACT, Fig. 8	11-13

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 29.08.02	国際調査報告の発送日 08.10.02
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 高木 茂樹 (印) 4 C 2938 電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	ENOMOTO, Hirayuki et al, Cbfal is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation, JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2000, Vol. 275, No. 12, pp8695-8702, 全文, 特に第8695頁ABSTRACT, FIG. 7, 8	11-13
Y	小守壽文, 骨形成のマスター レギュレーターPebp2 α A/Cbfal, 蛋白質 核酸 酵素, 2000, Vol. 45, No. 1, pp13-17, 全文, 特に第15頁左欄第19-29行	11-13
Y	US 6077987 A (NORTH SHORE-LONG ISLAND JEWISH RESEARCH INSTITUTE) 2000. 06. 20, 全文, 特に請求項1-9, ABSTRACT, 第8欄第60行-第9欄第14行 (ファミリーなし)	11-13
Y	吉川隆章, 培養骨移植による骨再生-培養骨髄細胞によるティッショーエンジニアリング, 2000, 蛋白質 核酸 酵素, Vol45, No. 13, pp2289-2296, 全文, 特に第2290頁左欄第6-9行	11-13
Y	WO 98/30234 A (IWAMOTO, Masahiro) 1998. 07. 16, 全文, 特に第1頁 第6-18行 & JP 10-194987 A	11-13

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 1-10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲1-10は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。